

図9. 蚊の幼虫からRDB法を用いて得られた細菌の配列

- Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0002A120.
- Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C113.
- Uncultured bacterium clone E78-204 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured bacterium clone ORSPEP_c03 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured Frankiaceae bacterium clone Amb_16S_866 16S ribosomal RNA
- Uncultured bacterium clone E71-205 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured bacterium clone sE12-101 16S ribosomal RNA gene
- Uncultured Neisseria sp. clone IS024B83 16S ribosomal RNA gene

図10. 国内で検出されたネコモルビリウイルスの系統樹

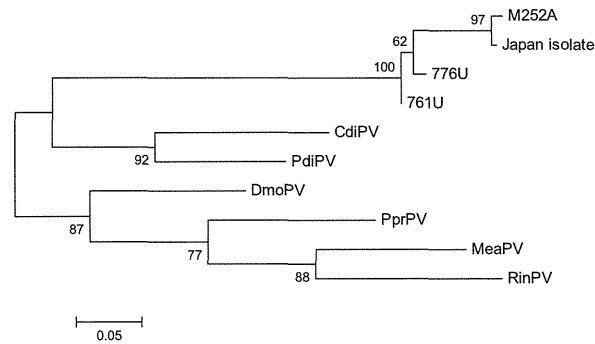


図11. 国内で検出されたトリボルナウイルスNおよびM領域の系統樹解析

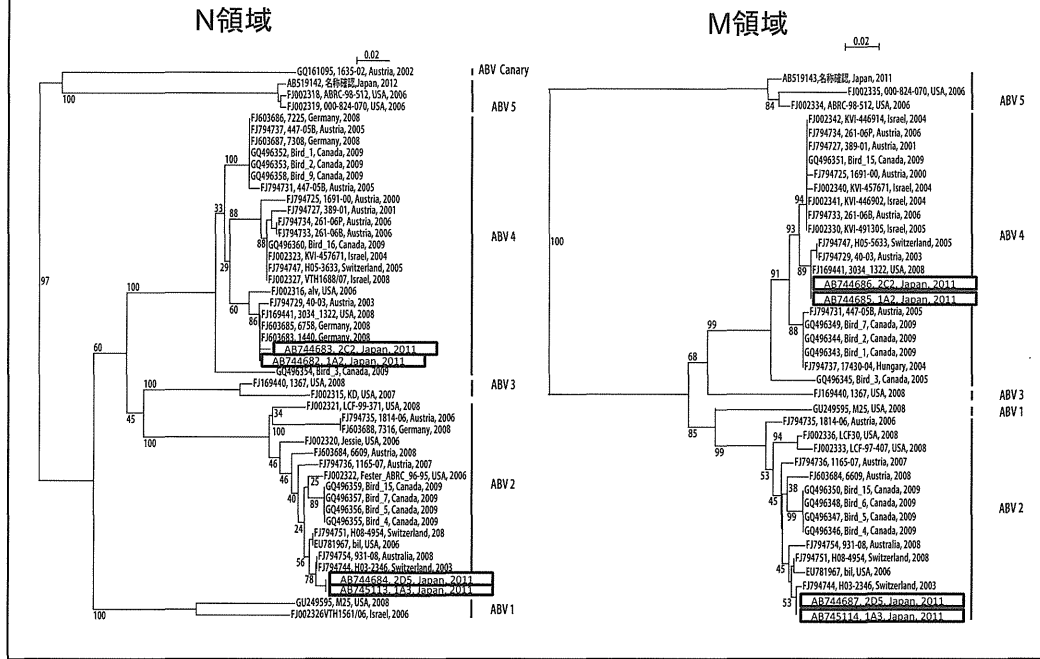


表1. コウモリ小腸におけるDNAウイルスの網羅的検出

プールID	総コンティグ数	相同性を示したウイルス	ヒットしたコンティグ数	E-value (最低値)
1	72	Mason-Pfizer monkey virus	4	1.07E-82
		RD114 retrovirus	1	6.12E-24
2	115	Mason-Pfizer monkey virus	2	4.28E-107
		Simian retrovirus 4	1	2.33E-10
		Jaagsiekte sheep retrovirus	1	1.50E-17
3	107	Squirrel monkey retrovirus	2	1.52E-109
		Mason-Pfizer monkey virus	1	1.14E-77
		Ovian enzootic nasal tumor virus	1	1.97E-36
		Simian retrovirus 4	2	1.33E-33
4	67	Mason-Pfizer monkey virus	2	2.56E-111
		Squirrel monkey retrovirus	2	1.53E-98
		Ovine enzootic nasal tumor virus	1	1.04E-58
		Simian retrovirus 4	1	8.31E-10
		human herpesvirus 6B	1	4.59E-89
5	131	Jaagsiekte sheep retrovirus	1	1.89E-89
		Murine type C retrovirus	1	6.52E-62
		Feline leukemia virus	3	7.86E-24
		Cafeteria roenbergensis virus	1	1.65E-27
		Friend murine leukemia virus	1	9.63E-23
		Gibbon ape leukemia virus	1	1.42E-22
		Mason-Pfizer monkey virus	1	1.20E-68
6	107	Gibbon ape leukemia virus	2	9.31E-51
		PreXMRV-1 provirus	1	9.76E-05
		Feline leukemia virus	2	2.04E-48
7	65	Gibbon ape leukemia virus	1	2.46E-43
		human herpesvirus 6B	1	1.71E-23
		PreXMRV-1 provirus	1	2.06E-19
		Megavirus chilensis	1	1.40E-05

表2. コウモリ肺におけるDNAウイルスの網羅的検出

プールID	総コンティグ数	相同性を示したウイルス	ヒットしたコンティグ数	E-value (最低値)
1	156	Mason-Pfizer monkey virus	2	1.04E-66
		Ovine enzootic nasal tumor virus	2	4.15E-63
		Simian retrovirus 4	2	2.50E-48
		RD114 retrovirus	1	7.44E-40
		Choristoneura occidentalis granulovirus	1	2.56E-20
		Squirrel monkey retrovirus	1	8.42E-08
		Mason-Pfizer monkey virus	1	2.62E-110
2	179	Squirrel monkey retrovirus	3	2.41E-102
		Ovine enzootic nasal tumor virus	3	2.93E-59
		Reticuloendotheliosis virus	1	3.99E-48
		Gibbon ape leukemia virus	1	5.19E-22
		Simian retrovirus 4	1	6.32E-09
		Choristoneura occidentalis granulovirus	1	1.36E-15
		Mason-Pfizer monkey virus	2	3.94E-112
3	146	Ovine enzootic nasal tumor virus	2	5.55E-55
		Reticuloendotheliosis virus	1	2.24E-55
		Friend murine leukemia virus	1	3.77E-42
		Choristoneura occidentalis granulovirus	2	2.12E-20
		Gibbon ape leukemia virus	1	1.10E-19
		Simian retrovirus 4	1	1.58E-09
		Squirrel monkey retrovirus	2	5.46E-08
4	54	Murine type C retrovirus	1	4.79E-78
		Moloney murine leukemia virus	1	3.54E-66
		Feline leukemia virus	1	3.09E-42
		Gibbon ape leukemia virus	2	1.94E-24
5	236	Jaagsiekte sheep retrovirus	2	2.81E-172
		Mason-Pfizer monkey virus	2	6.10E-87
		Friend murine leukemia virus	1	5.94E-71
		Murine type C retrovirus	2	1.47E-59
		Enzootic nasal tumor virus	1	3.99E-51
		Gibbon ape leukemia virus	2	1.20E-48
		Rauscher murine leukemia virus	2	6.30E-45
6	101	Cafeteria roenbergensis virus	1	7.38E-32
		Ovine enzootic nasal tumor virus	1	1.62E-22
		Trichoplusia ni SNPV	1	1.32E-12
		Human herpesvirus 6B	1	7.85E-80
		Mason-Pfizer monkey virus	1	1.19E-50
		Saimirine herpesvirus 1	1	2.95E-38
		Cafeteria roenbergensis virus	1	5.00E-37
		Enzootic nasal tumor virus	1	1.27E-37
		Gibbon ape leukemia virus	1	1.71E-33
		Jaagsiekte sheep retrovirus	1	4.22E-21
7	92	PreXMRV-1 provirus	1	5.48E-11
		RD114 retrovirus	1	3.08E-06
		Mason-Pfizer monkey virus	3	2.97E-77
		Ovine enzootic nasal tumor virus	1	1.39E-46
		Simian retrovirus 4	1	3.96E-41

表3. コウモリ血餅におけるDNAウイルスの網羅的検出

プールID	総コンティグ数	相同性を示したウイルス	ヒットしたコンティグ数	E-value (最低値)
1	143	Mason-Pfizer monkey virus	2	3.92E-112
		Squirrel monkey retrovirus	3	4.13E-99
		Ovine enzootic nasal tumor virus	2	2.52E-75
		Gibbon ape leukemia virus	1	2.98E-24
		Choristoneura occidentalis granulovirus	1	1.41E-15
		Friend murine leukemia virus	1	1.51E-11
		Simian retrovirus 4	1	1.99E-09
2	74	Squirrel monkey retrovirus	1	1.36E-128
		Mason-Pfizer monkey virus	1	1.06E-39
		Simian retrovirus 4	1	1.39E-09
		Squirrel monkey retrovirus	2	1.57E-07
3	408	Squirrel monkey retrovirus	1	7.49E-07
		Megavirus chilensis	1	1.17E-06
		Amsacta moorei entomopoxvirus	1	1.84E-05
		PreXMRV-1 provirus	1	5.86E-35
4	1661	Enzootic nasal tumor virus	1	1.17E-22
		Saimirine herpesvirus 2	1	4.01E-08
		Cafeteria roenbergensis virus	3	4.00E-07
		Yoka poxvirus	1	3.11E-06
		Amsacta moorei entomopoxvirus	5	4.39E-08
		Choristoneura occidentalis granulovirus	1	3.09E-06
		Megavirus chilensis	2	3.03E-05
		Acanthamoeba polyphaga mimivirus	3	3.86E-05
		Gryllus bimaculatus mudivirus	1	2.25E-05
		Sulfolobus islandicus rod-shaped virus	1	1.21E-05
5	1319	Paramecium bursaria Chlorella virus 1	1	1.19E-47
		Amsacta moorei entomopoxvirus	1	3.45E-14
		Cafeteria roenbergensis virus	3	8.43E-10
		Megavirus chilensis	3	8.42E-07
		Glossina pallidipes salivary gland hypertrophy virus	1	9.10E-07
		Deerpox virus	1	5.95E-05
6	1113	RD114 retrovirus	1	2.08E-12
		Cafeteria roenbergensis virus	5	7.48E-10
		Choristoneura occidentalis granulovirus	1	3.66E-09
		Saimirine herpesvirus 2	1	2.01E-06
		Amsacta moorei entomopoxvirus	4	6.07E-08
		Megavirus chilensis	2	1.71E-05
		Wiseana iridescent virus	1	3.09E-05
		Glossina pallidipes salivary gland hypertrophy virus	1	9.35E-06
Goatpox virus	1	1.47E-05		

厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の
診断等の対応方法に関する研究

分担研究課題：新種、新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定法の開発

研究分担者：遠藤大二（酪農学園大学獣医学類教授）

研究要旨：本研究は変異ウイルスの出現に対応可能な迅速検査用ウイルス検出用プライマーの設計アルゴリズムの開発を目的として進められた。3種のアプローチを試行した結果、実績のあるプライマー設計プログラムと独自のプライマー相同性判定プログラムを連結することにより、ハンタウイルスについて、10コピーまでを検出可能で、設計対象のみならず近縁のウイルスを検出可能な設計方法を確立した。これらの結果から、最終年度において報告するプライマー設計アルゴリズムについて実用性が示唆された。

研究協力者：水谷哲也（東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター）、有川二郎、吉松組子（北海道大学院医学研究科微生物学講座病原微生物学分野）

担当した。

RDV法は、不特定に増幅した遺伝子の分析に基づくため、主として培養細胞で分離されたウイルスの遺伝子検出法に有効である。現在、宿主遺伝子除去法と新たな遺伝子増殖法により、血清などの臨床検体からのウイルス遺伝子検出が可能となっているが、検出感度と操作時間がかかるという制約条件がある。そのため、ウイルス出現のサーベイランスのためには、検出範囲が限定的でも迅速・高感度な方法との連携が望ましい。このため、分担者は、通常のPCR検査に適用可能で、変異に対応可能なウイルス種特異的プライマーを設計するためのアルゴリズムの改良を行ってきた。RDV法を補佐する方法としての要件としては、

A 研究目的

変異や新型のウイルスは、既知のウイルス塩基配列の増加にもかかわらず、出現しており、今後も対応の必用が示唆されている。新種ウイルスの核酸を検出する方法は、ウイルス核酸の比率を高めた後に非特異的に核酸断片を増幅する方法と、ウイルス核酸を含む試料を増幅対象の広いPCRプライマーを用いて増幅する方法に分類される。前者はRDV法として水谷が担当し、分担者は後者の増幅対象の広いプライマー設計を

検査材料中のウイルスを検出するため検出限界を 10 コピーと設定し、変異・新型ウイルスに対応するため設計対象のみならず設計対象以外の近縁のウイルスを検出可能なことの 2 点とした。

増幅対象の広いプライマーは、類縁性の高いウイルスについて配列を整列し、一致した塩基をそのまま採用し、異なる塩基については、各ウイルスの持つ配列中を共通して示す縮重塩基を縮重配列として用いる。縮重塩基を用いたプライマーによる PCR 検査は通常のプライマーを用いた PCR と同じ方法で実施されるため、PCR と同様 2-3 時間で結果を得ることができる。また縮重塩基は通常塩基と同一コストで合成されるため、低コストで実施可能である。縮重塩基を用いた PCR では、多数の縮重塩基を利用することにより、多数のウイルス種が同時に検出される。一方では、縮重塩基は PCR による検出感度を低下させるため、適切な数の縮重塩基を含むプライマーの設計方法が課題となっており、バイオインフォマティクスにおいては縮重プライマー問題としてアルゴリズム開発の対象とされてきた。これまでに、10 以上の縮重プライマー設計プログラムが設計されてきたが、いずれのプログラムでも変異ウイルスを高感度に増幅するプライマーは安定して得られない。本研究でも、2010 年から縮重塩基を調整しつつ、検出感度を勘案しつつ可能な限り多数のウイルスを検出対象とする独自のプライマー設計アルゴリズムの改善を進めてきた(図 1)。2010 年度においては、アレナウイ

ルス科全体をカバーする 3 組のプライマーセットで増幅可能な縮重プライマーが設計された。これらの縮重プライマーは、モデル分子を効率良く増幅したが、感染細胞由来の cDNA については PCR 増幅効率は低かった。一方、2010 年頃から、ゲノムの増幅記録から縮重塩基の利用数と検出感度の関係が多数の縮重プライマーの利用結果から蓄積され、プライマーあたりの縮重塩基の利用数が 4 以下に制限する必要が明らかになった。2011 年度は、この文献的知見を利用し、プライマーあたりの縮重塩基数を 4 に制限しつつ感染細胞 cDNA を効率良く増幅することが可能な最低の縮重プライマーを設計できる様、アルゴリズムを改善した。2012 年度は、2011 年度までのプライマーが持っていた検出感度の低さを改善すべく、標準のウイルス粒子を用いて設計の基本を見直し、検出感度を達成している範囲において複数種のウイルスを増幅可能なプライマー設計方法を開発した。

B 研究方法

1. 塩基配列の記載方法：

塩基配列および縮重配列は、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB)による Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences, Recommendations 1984 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>) に従った。

2. プライマー設計プログラムの概要：

1) 開発環境

プライマー設計プログラム(Co-ordination of common motifs: CoCoMo アルゴリズム)を稼働するためのオペレーティングシステムとしては、Linux (Ubuntu10.04 または 10.10)を用いた。

開発言語としては、Ruby 1.87 を、同言語のバイオインフォマティクス用の拡張モジュールとしては BioRuby を、データベースとの接続モジュールとしては MySQL/Ruby を使用した。データを格納・処理するためのデータベースには MySQL 5.1 (<http://dev.mysql.com/>)を使用した。

2) 連携プログラム

塩基配列間の相同性を算出するためには、USEARCH プログラム(version 5.1-5.3, <http://www.drive5.com/usearch/>)を使用した。複数のウイルスの塩基配列を整列させるためには、MAFFT プログラム(version 6.1, <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>)を用いた。多数の配列を相同性を指標としてグループ化するためのプログラムとしてはクラスタリングソフト MCL プログラム (version 1.1-3.3.5, <http://www.micans.org/mcl/>)を利用した。2012年度においては、プライマーの一次候補設計プログラムとして Primer3(<http://primer3.sourceforge.net/>)を用いた。

3. 対象ウイルスデータ

各ウイルスの既知のゲノム塩基配列データは、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

((2010-2011 年度)または Virus Pathogen Resource (<http://www.viprbrc.org/brc/home.do?decorator=vipr>)よりダウンロードし、独自制作した Ruby プログラムにより MySQL のテーブルに格納し、Primer 設計アルゴリズムに使用した。

4. Primer 設計アルゴリズムの構成

1) 2010 年度(図 2A-C)

3'末端の5塩基中4塩基が同一な配列をウイルス間で検索し、該当位置から 5'側の塩基もある程度一致している 23-25 塩基については、塩基が同一で無い位置には縮重塩基を割り当てることにより縮重塩基プライマーを設計した。

- 1) ウイルス遺伝子の収集と均質データベースの作成(図 2)。
- 2) ウイルス遺伝子産物アミノ配列の相同性の算出。
- 3) ウイルス遺伝子産物のクラスタ化(図 2)。
- 4) クラスタ内ウイルス遺伝子産物アミノ配列のアライメント(図 3)。
- 5) ウイルス遺伝子産物アミノ配列のアライメントを元にしたクラスタ内塩基配列アライメントの作成(図 3)。
- 6) クラスタ内共通塩基配列の作成と degeneracy の算出(図 4)。
- 7) degeneracy 条件を満たすプライマー候補 1 の選択(図 4)。
- 8) プライマー候補塩基配列の末端 degeneracy を元にしたプライマー候補 1 の方向の決定。

- 9) プライマー候補 1 の仮想 PCR(図 5)。
- 10) 仮想 PCR で 100-500 塩基の PCR 産物を生じることが予想されるプライマー候補 1 の選択(プライマー候補 2、図 5)
- 11) プライマー候補 2 についてリボゾーム RNA へのハイブリダイズの評価して点数化
- 12) プライマー候補 2 についてヘアピン構造の可能性を評価して点数化
- 13) プライマー候補 2 についてセルフダイマーの可能性を評価して点数化
- 14) プライマー候補 2 について仮想 PCR でヘテロダイマーを形成する可能性を評価して点数化
- 15) 11)~14)の評価点を合計してプライマー候補 2 の総合評価を算定。上位のプライマーをプライマー候補 3 とする。

2) 2011 年度(図 3)

本年度においては、まず、ウイルス遺伝子をアミノ酸配列の相同性にもとづいてクラスター化し、縮重塩基を含む数が少ないプライマーを設計した。また、予測されたプライマー候補を各プライマー位置ごとにクラスター解析することにより、縮重塩基が 4 個以下となるようにプライマーを設計した。

- 1) 対象ウイルスグループを限定
- 2) 遺伝子情報を抽出
- 3) 遺伝子情報で重複を除く
- 4) 重複しない遺伝子情報を元に遺伝子をグループ化
- 5) グループ化した遺伝子を整列

- 6) 整列上の共通領域からプライマー候補を選択
- 7) プライマー候補のグループ化: プライマーグループは対象遺伝子の領域によって異なる。グループが最低数となり、縮重塩基数が 4 以下となる領域から設計されたプライマーをこの時点の候補として採用した(図 2)。
- 8) プライマー候補の評価・順位づけ
- 9) 産物のサイズとプライマー間のダイマー形成の可能性の低さで順位をつけ、高順位のプライマーを予測プライマーとした。

3) 2012 年度(図 4AB)

2010 年度および 2011 年年度の設計アルゴリズムによるプライマーはいずれも検出感度が低く、プライマーの塩基配列の構成や立体構造に関する予測を改善する必要が示唆された。2012 年度においては、多数の研究で検出感度の高いプライマーを設計する実績を持ち、ソースコードが公開されている Primer3 プログラムをプライマーの基本設計ソフトとして取り入れることとした。また、ウイルスゲノムデータの入手については、GenBank からの入手データが研究の動向により大きく偏りがあり、特定の抗原遺伝子のみで設計対象が限定されてしまう場合が多い。これを修正するため、当該年度は、基本的にゲノムまたはセグメント全長のみの情報をプライマー設計に利用することとした。そのためのサイトとして、各ウイルスの病原性とゲノム・セグメントの

全長情報が集約されている Virus Pathogen Resource を用いることとした。具体的には下記の手順でプライマーを設計した。

- 1) 複数の設計対象ウイルスのゲノムまたはセグメント全長の配列について、Primer3 プログラムにより 8000 個程度のプライマーを設計する。
- 2) ウイルス間で共通性要件を満たすプライマーを選択する。その際の共通性要件は 3'末端から 4 塩基は完全に共通など申請者が設定した条件とし、その条件を高速で判定するプログラムは自主開発した。
- 3) 可能な限り広い範囲のウイルスでの共通性が②の共通性要件を満たすプライマーをプライマー候補とした。
- 4) 増幅ウイルス種の範囲・増幅サイズなどから順位を設定した。

3. ウイルス増幅用の鋳型または試料

- 1) 人工合成配列
2010 年度には、オリゴマー連結法により人工的に合成された DNA 断片を増幅試験の鋳型として使用した。
- 2) ウイルス種未同定生体材料
2011 年度には、山口大学獣医学部(試料 1 および 2)および酪農学園大学ウイルス学教育ユニット(試料 3)から分与を受けた、ウイルス分離および分離者による予想は表 5 に示す通りであった。
- 3) 標準ウイルス試料
ウイルスゲノムを鋳型とした高感度の検出法を確立するため、ニューカッ

ス病ウイルス(NDV)の培養上清を使用した。北海道大学大学院獣医学研究科感染症学教室から分与された 10^7 CPU/ml の溶液を、プライマー設計のための基礎データを入手するために用いた。

4) 検出試験用ウイルス試料

2012 年度には設計時に対象としなかったウイルスも含めた検出試験を実施した。そのための試料としては、北海道大学大学院医学研究科病原微生物学研究室のハンタウイルスの培養上清を用いた(表 6)。

4. ウイルスおよびウイルス感染細胞からの cDNA の作成

- 1) 培養上清からの DNA/RNA 採取
低コピーのウイルス RNA を安定して保存するため、RNA 抽出・保存用の濾紙を用いた (RNA sound paper: <http://metammune.com/index.html>)(2012 年度)。
- 2) 培養上清からの DNA/RNA 抽出
培養上清に含まれるウイルス RNA/DNA は、直接またはウイルス RNA を保存している濾紙から、PureLink viral RNA/DNA purification kit(Life Technologies)を用いて抽出された(2011 年度・2012 年度)。
- 3) 感染細胞からの RNA 抽出
感染細胞から TRIzol(Life Technologies)を用いて RNA を抽出した(2011 年度)。抽出後、RNA は細胞 10^7 個あたり 200 μ l の割合で DW に溶解された。
- 4) cDNA の合成

培養上清から抽出した DNA/RNA および感染細胞から抽出した RNA を溶液量 1:1 の割合で混合し、RNA 試料溶液として用いた。混合された試料 RNA 溶液は、TransPlex Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich)によって増幅され cDNA としてウイルス検出試験に用いられた(2011 年度)。濾紙から抽出された RNA については、TOYOBO RivaTraAce cDNA 合成キットによる cDNA 合成の鋳型として用いられた。

5. 縮重プライマーによる PCR

増幅試料 cDNA を鋳型とした PCR は、HotStartGoTaq Green PCR Mix (プロメガ)によって実施された。反応条件としては、低アニーリング温度での増幅条件を用いられた(2010 年度・2011 年度)。すなわち、2×GoTaqMix (Mg₂+ plus) 12.5 μl、200 pmol の各縮重プライマー、プライマー検証用 DNA 断片に滅菌蒸留水を 25 μl となるように混合し、反応溶液とした。反応は 95°C 2 min の後、[94°C 30 sec— 46°C 30 sec — 72°C 30 sec]の反応を 33 回行った。最後に 72°C 5 min の反応を一回行い 8°C で保温した。

反応特異性を高めるためには、95°C 2 min の後、[94°C 30 sec— 55°C 30 sec — 72°C 30 sec]の条件での反応が 33 サイクル行われた(2012 年度)。

6. マイクロチップゲル電気泳動

メーカーの手順書に従い、PCR 反応後の

反応溶液を機器にセットし、分析した。本報告では、100~400 塩基の PCR 産物が分析対象となったため、分離緩衝液として DNA-500 Separation buffer (島津)を、マーカーとして DNA-500 marker for MultiNA(島津)を用いた。

C 結果

1. 2010 年度

1) プライマー設計アルゴリズム

プライマー設計の対象として、前年度にクラスターを報告したアレナウイルス科ウイルスの L セグメントの polymerase 遺伝子の中央部約 200 塩基を選択した。また、ブニヤウイルス科ハンタウイルス属の M セグメント上の糖タンパクプリカーサー(glycoprotein precursor: GPC)遺伝子の中央部および 3'側の保存領域を選択した。続けて、本年度改善された PCR 設計プログラムの稼動を確認するため、アレナウイルス Polymerase の 1kbp 断片およびハンタウイルスの S-segment ORF 全長を対象としてプライマーが設計された(表 1-4)。

2) 短い共通領域での degenerate PCR 条件の検討

① アレナウイルス

アレナウイルス科ウイルスの L セグメントの polymerase 遺伝子の中央部約 200 塩基に注目した。鋳型配列の対象としてこの領域周辺のアミノ酸配列を元に平準化された 19 種のアレナウイルスの

polymerase 遺伝子断片を用いた(表 1)。クラスターを探索する領域を徐々に変えながら、比較的多数のウイルスが含まれたクラスターを形成した 2 つの領域についてプライマーが設計された。それぞれの領域について 10 種のアレナウイルスの遺伝子データ(表 1)から塩基配列を収集し、PCR 試験に用いる人工遺伝子断片を合成した。これらの人工遺伝子をコピー数 $10^9 \sim 10^2$ となるように希釈し、アレナウイルスの網羅的検出を目的として設計された degenerate プライマー(表 2)により PCR を実施した(図 5)。その結果、 10^4 、 10^2 または 10^1 コピーの感度でそれぞれ 20 通りの組み合わせのうち、6、4 および 10 通りで PCR が確認された。

② ハンタウイルス

CoCoMo アルゴリズムによるプライマー設計にあたっては、M フラグメントの保存領域の相同性を種間で比較し、多くの種を含む二つのクラスターを設定した。クラスターの設定にあたっては、PCR 検出の感度を検討する実験を計画したため、PCR 産物を 200 塩基程度の領域に絞り(表 3)、網羅性を優先する指標としてプライマーを設計した(表 4)。

続いて、PCR 試験に用いる人工遺伝子断片を合成し、コピー数 $10^9 \sim 10^0$ となるように希釈し、ハンタウイルス属共通検出用プライマーにより PCR を実施した(図 6)。その結果、 10^1 または 10^0 コピーの感度でそれぞれ 10 通りの組み合わせのうち、2 および 8 通りで PCR が確認され

た。

2. 2011 年度

1) プライマー設計アルゴリズム

検出効率を改善し、縮重プライマーの設計対象自体をプログラムが選定していくアルゴリズムにより、増幅要件を基本的に満たしたプライマーが自動設計された。主要なウイルス科についての設計試行ではウイルス科を 1~171 のグループに分けることにより増幅が予測されるプライマーが設計された(表 7)。

2) PCR 結果

未知試料に感染しているウイルスが不明であるため、可能性の高い 14 のウイルス科を検出するための 54 組のプライマーペアを用いた PCR を実施した。代表的結果を図 7 に示す。11 のウイルス科について、3 種の cDNA のいずれかについて単一バンドの PCR が観察された(表 8)。しかしながら、2012 年度にこれらの増幅結果の塩基配列を調査したところ、いずれも細菌の遺伝子を増幅しており、低コピーのウイルスの増幅の難しさとウイルス未知試料でウイルスを同定するためには、プライマーの特異性と感度を増す必要が示された。

2012 年度

1) プライマー設計

2011 年度までのアルゴリズムでのプライマーを、世界的に広く使われている設計プログラム(Primer3)によるプライマーと比較したところ、増幅効率は Primer3 によるプ

ライマーの方が明らかに優れていた。この結果から、Primer3 に含まれているプライマーの熱力学的性質を予測するアルゴリズムが優れていることが示唆された。そのため、2012 年度には、プライマーの基本的設計を Primer3 に行わせ、それらのプライマー間での相同性から、特定のウイルスグループを共通して増幅する縮重プライマーを設計した。全ハンタウイルスを対象としてプライマーの設計を試みたところ、新世界ハンタウイルスと旧世界ハンタウイルスに共通するプライマーは設計されなかった。この設計範囲は、2011 年度の設計アルゴリズムよりも設計上の対象ウイルス範囲がさらに狭いことが示唆された。検出感度としては、それぞれの範囲で設計されたプライマーを用いることにより、PCR チューブあたり 10 コピーのウイルスを増幅可能であることが示された。

2) PCR 結果

プライマーをユーラシア大陸の 5 種 7 株のハンタウイルスを増幅する様設計した(表 9)。全株を増幅する 1 組のプライマーが得られたが、5 組中 4 組は一部の株でのみ増幅産物が見られた。また、順次 1 株を設計から除いた結果、Dabesian, Soul SR-11 および Hantaan ウイルスでは、設計対象から除かれたウイルスの増幅は認められなかったが、Thai, Soul Gou3, Dobrava-Belgrade Slovakia および Dobrava-Belgrade Saaremaa では一部のプライマーで設計対象では無いウイルスの増幅が認められた(表 10)。

D. 考察

多数の遺伝子から共通する塩基配列を検出する作業は、計算技術の向上とデータベースの高度化から、2000 年ごろには日常的に実施可能なことであると予想されていた。しかしながら、20 塩基以上のオリゴマーのとり得る塩基配列パターン莫大な数になるため、「単純に」全てのパターンを網羅しつつ共通かつ最適な塩基配列パターンを選択することはスーパーコンピュータを用いた場合でも極めて難しいことが判明した。

一方近年、データと可能性が莫大である問題について、最適に近い解答を作出できるアルゴリズムという計算手法が実績を上げている。本研究では、ウイルス検出を多数行ってきたウイルス専門家の研究班にバイオインフォーマティクス技術を持つ分担者が寄与することにより、ウイルスプライマーの選定作業をシステムティックにコンピュータ上で実現してきた。多数・多種のウイルスについての試行を重ねる事により新種ウイルス検出のための効果的な方法の作出を目指した。

分担者らは、個々の研究者が目視で行なってきたプライマー設計をコンピュータ内の計算で実施することにより、従来よりも網羅性の高い縮重塩基を含むプライマー設計してきた。プライマーの 3'領域で縮重塩基を用いていない場合、PCR の感度が高くなる傾向にもとづき、2010 年度および 2011 年度には 3'末端 5 塩基中 4 塩基がウイルス

間で保存されていてプライマーで非縮重塩基が用いられるような領域を探索することにより縮重塩基は含むが増幅可能なプライマーを設計した。「保存領域の大体の場所」を特定することが難しいため、その作業の代役として可能な小プログラムを連結させていくという方法で改善を進めてきた。

2010年度は、ウイルス科を3組のプライマーセットで網羅可能な程度まで設計技術を向上させることができたが、検出感度は網羅性の向上にともない退行し、2010年度に設計したプライマーは 10^7 コピーのウイルス遺伝子断片を必要とした。2011年度は、設計対象を遺伝子に限定し、アミノ酸配列の相同性を分析することにより検出感度を改善し、精製された鋳型DNAを 10^2 コピーまで検出することができた。この改善にもかかわらず、実際のウイルスRNAから作成されたcDNAでは、結果的に有効なウイルス増幅が観察されなかった。

2011年度においては、実際のウイルスRNAを検出するためのプライマー設計を進めた。前提として、低コピーのウイルスRNAを維持する必要があったが、このための保存方法として、RNA抽出・保存専用濾紙に注目した。前年度までの溶液中でRNAを保存する手技では、時間経過とともにRNAが分解されたため、感度を安定して調べるのが難しかったが、抽出・保存用の濾紙の導入により安定した解析が可能になった。続けて、低コピーのPCRを成功させる条件を再検討した結果、世界的に利用されているPrimer3プログラムの方が、通常

塩基のみのプライマー設計においては分担者らによって開発されたプログラムよりも優れていることが明らかとなった。そのため、プログラム中にPrimer3を組み込み、検出感度の高いプライマー設計を可能にしたうえで、それらの混合を想定することにより、縮重プライマーを設計した。

2012年度には、対象ウイルスの病原性を勘案しつつプライマー設計が可能なしくみとして、ウイルスの病原性が明示的に示されているウイルスゲノムデータベースと連動するプログラムを作成した。このことにより、研究者は、各ウイルスの専門家の知見を確認しつつプライマー設計を進めることが可能になることが予想される。

最終年度での改善により、生体材料中のウイルスを安定して高感度で検査可能なしくみが提供された。この方法によって、新種のウイルスを検出する可能性を検討するために、5種7株のハンタウイルスを用いて、設計時に除外したウイルスを検出する試みを行った。まず、多数のプライマーセットを試行する際に全ての対象ウイルスを増幅するプライマーは20%以下にとどまった。このことから、10コピー程度の低コピー数のウイルスRNAを対象としている際には、完全な正解を常に導出できないという制約が示された。ただし、低コピーにもかかわらず、これほどの感度でウイルスが検出される縮重塩基の設計プログラムは報告されていないため、一定の価値はあると考えられる。さらに、7株中4株では設計時に想定されていないウイルスでもバンドが認め

られたことから、プライマーを組み合わせることにより、新種ウイルスを検出する可能性が示唆された。

上記のプライマー設計アルゴリズムの改善により、ある程度の範囲のウイルスについて高感度で迅速にウイルスを検出する方法が提供できた。開発されたアルゴリズムでは、ウイルス属あたり 4-5 セット以上のプライマーを必要とすることがハンタウイルスの実験から示唆される。高感度での検出は、ウイルスのコピー数が限られていると考えられる生体材料を想定した場合、感度を重視して少数の共通プライマーセットへの要約は諦める必要が示唆された。一方、近年の核酸保存方法、核酸非特異的増幅法およびリアルタイム PCR 法の普及は、多数のプライマーセットによる PCR 検査のコストと時間を下げているため、本アルゴリズムは今後の利用に適した方法といえる。

E. 結論

原因不明の疾患を解明するため、近縁種のウイルスを増幅可能なプライマー設計アルゴリズムを作成・検証した。ウイルスの培養上清を用いた実験で、複数種のウイルスを共通して高感度で増幅することができ、また、プライマーの設計対象から外れたウイルスも増幅可能であったことから本方法の実用性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

遠藤大二「修復遺伝子をクローニングするためのプライマー設計」放射線生物研究 45 巻 2 号 170-182

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 ウイルス科を網羅するためのプライマー設計方法の概要

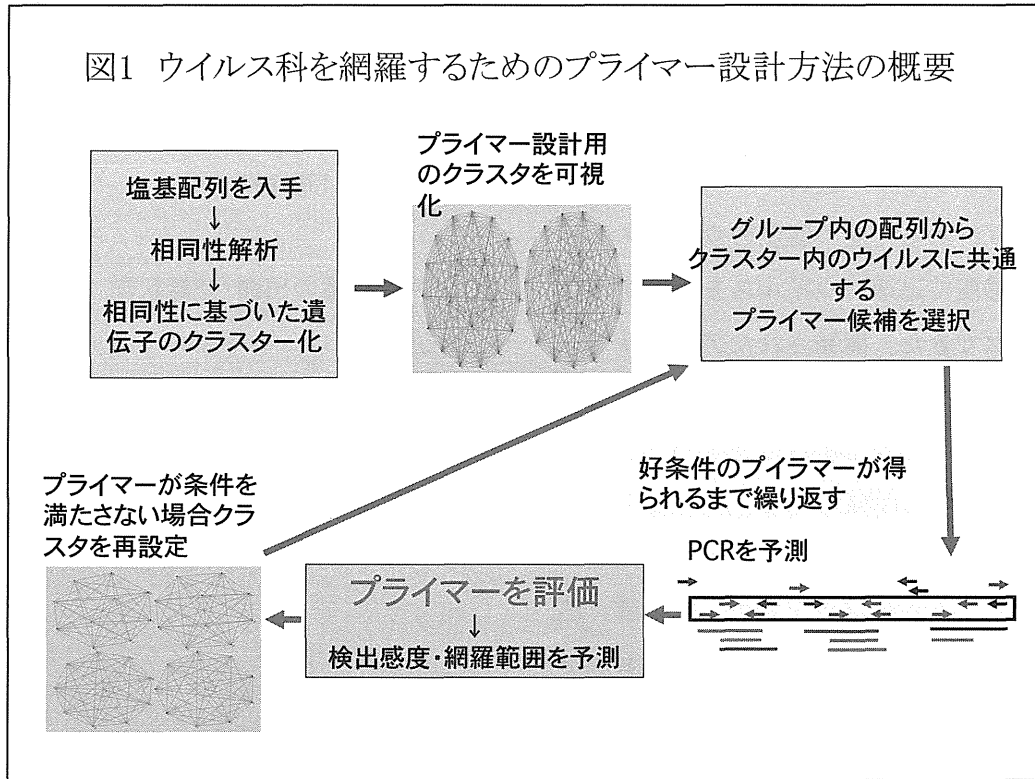


図2 2010年度開発プライマー設計アルゴリズム

図2A アミノ酸配列のアライメントに基づく核酸アライメントの生成

A株 ATGGCAACTATGGAAGAAATCCAGAGAGAAATC
 B株 ATGGCATCTATGCAAGAAATCCAAAGAGAAATC
 C株 ATGCCAATGGCCGAAATCCCGAGAGAACTC

A株 MATMEEIQREI
 B株 MASMQEIQREI
 C株 M-EMAELPREL

A株 ATGGCAACTATGGAAGAAATCCAGAGAGAAATC
 B株 ATGGCATCTATGCAAGAAATCCAAAGAGAAATC
 C株 ATG--CCAATGGCCGAAATCCCGAGAGAACTC

クラスター内の遺伝子データから、塩基配列のアライメントを作成する手順を示す。遺伝子の塩基配列(上段)から、翻訳産物のアミノ酸配列にデータを転換し、そのアミノ酸配列についてMAFFTプログラムを用いてアライメントを作成した(中段)。さらにアミノ酸配列のアライメントから、各アミノ酸の元になるコドンを再構成することにより塩基配列のアライメントを作成した(下段)。赤枠と矢印で塩基配列アライメント作成方法の事例を示した。塩基配列アライメント作成の際には、アミノ酸配列アライメントでのギャップは3塩基分のギャップとなった。

図2B 塩基配列アライメント上でのプライマー候補の選択

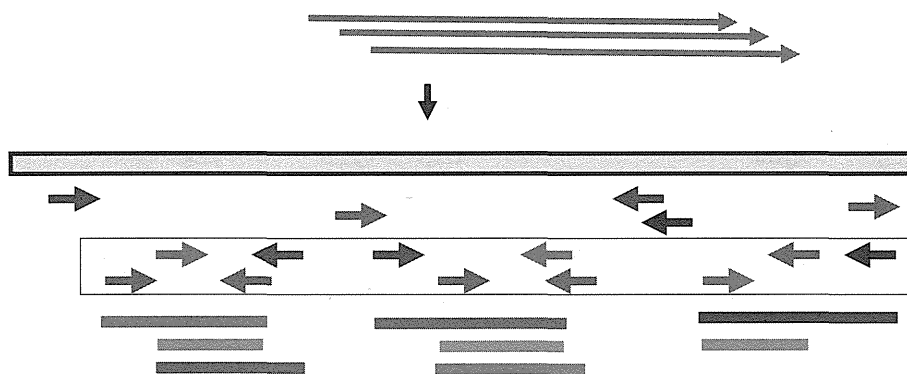
A株 ATGGCAACTATGGAAGAAATCCAGAGAGAAATC
 B株 ATGGCATCTATGCAAGAAATCCAAAGAGAAATC
 C株 ATG---CCAATGGCCGAAATCCCGAGAGAACTC
 共通配列 ATG---HCWATGSMMGAAATCCMRAGAGAAMTC
 Degeneracy 111---31211122211111122111111211



塩基配列のアライメントからプライマー候補1を選択する手順。図3下段の塩基配列アライメントから、塩基配列アライメント上で共通配列をdegenerate配列として作成された(中段)。プライマー候補は共通配列から以下の条件を満たす配列として選択される。条件:①ギャップを含まない、②いずれかの末端6塩基にはdegenerate塩基を1個のみ含む、③残り15塩基のdegeneracyの積算値が2048以下、④全長21塩基。

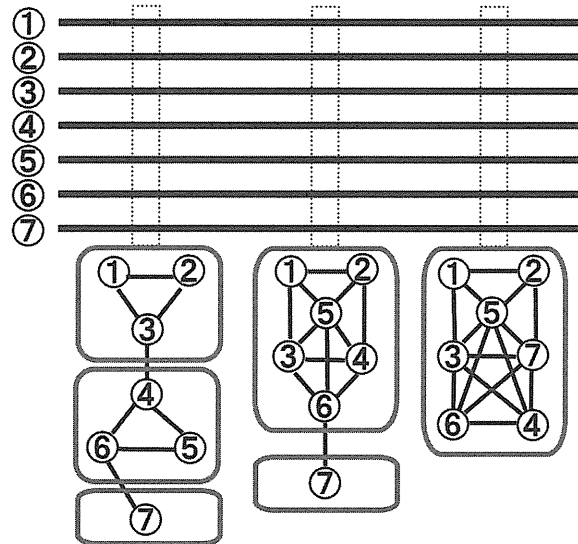
図2C アライメントに基づくプライマー候補2の選択

共通 ATG---HCWATGSMMGAAATCCMRAGAGAAMTC



アライメントの共通配列から選択されたプライマー候補1(上段)の方向と遺伝子上の位置に基づき、仮想PCRを実施し、100~500塩基対のPCR産物を生じるプライマー候補1のみをプライマー候補2とした(下段)。

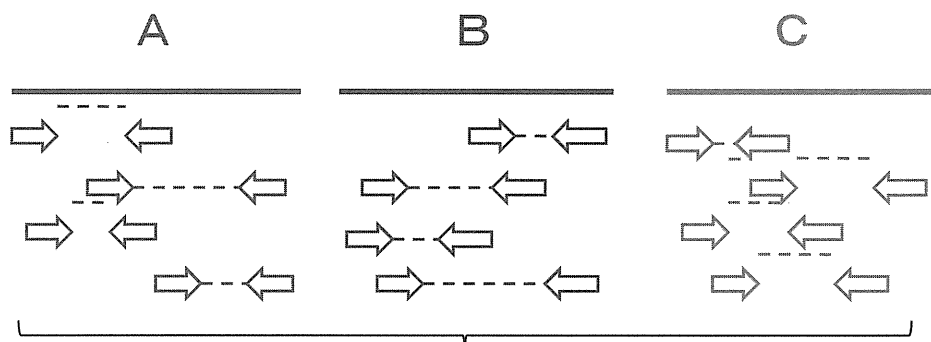
図3 2011年度に改善されたプライマー設計アルゴリズム



候補遺伝子を番号で示す。プライマーは設計位置ごとにプライマー候補配列同士の相同性に基づくクラスター解析実施することにより、従来よりも検出感度の高いプライマーが設計された。

図4 2012年度開発プライマー設計アルゴリズム

図4A Primer3によるプライマーの設計



ゲノムについてPrimer3プログラムにより各8000組のプライマーを設計

図4B 縮重条件に適合するプライマーの選択

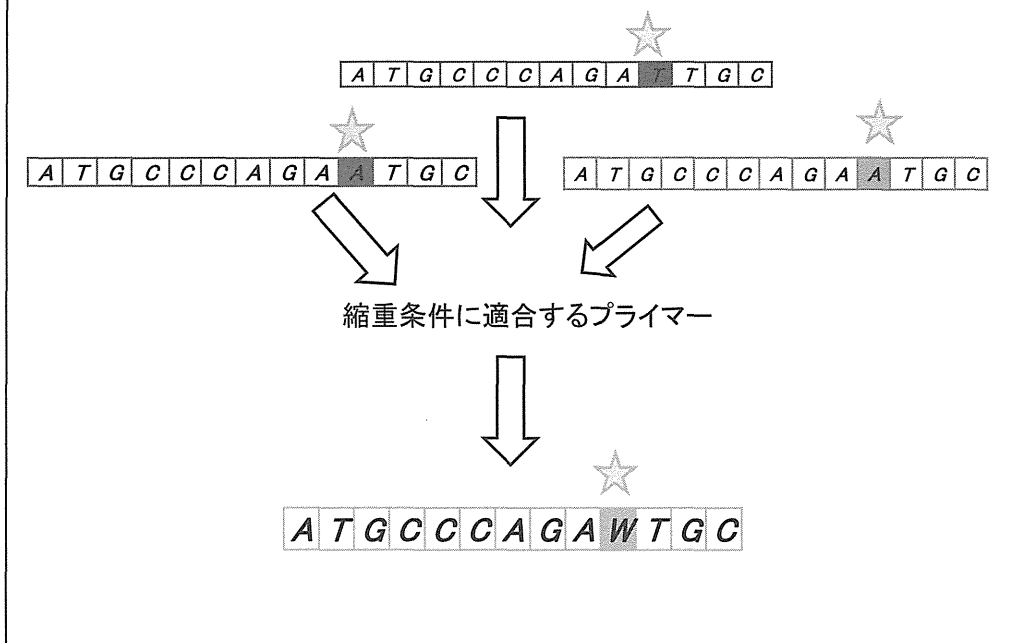


表1 アレナウイルス用プライマーの検証対象としたウイルス種およびセグメントLの塩基配列Accession番(2010年度)

Accession	種名	略称	分類
NC_010249	Allpahuayo virus	ALLV	New world arenaviruses
NC_010251	Amapari virus	AMAV	New world arenaviruses
NC_010255	Bear Canyon virus	BCNV	New world arenaviruses
NC_010759	Flexal virus	FLEV	New world arenaviruses
DQ489718	Junin virus	JUNV	New world arenaviruses
NC_012777	LuJo virus	LuJo	Unclassified arenaviruses
NC_005079	Machupo virus	MACV	New world arenaviruses
NC_010250	Oliveros virus	OLVV	New world arenaviruses
NC_010761	Parana virus	PARV	New world arenaviruses
NC_006313	Sabia virus	SABV	New world arenaviruses
NC_010702	Tamiami virus	TAMV	New world arenaviruses
NC_004292	Tacaribe virus	TCRV	New world arenaviruses
NC_010563	Chapare virus	CHAPV	unclassified New world arenaviruses
NC_007906	Ippy virus	IPPYV	Old world arenaviruses
NC_004297	Lassa virus	LASV	Old world arenaviruses
DQ868488	Lymphocytic choriomeningitis virus	LCMV	Old world arenaviruses
NC_007904	Mobala virus	MOBV	Old world arenaviruses
NC_006572	Mopeia Lassa reassortant 29	MOPLAS	Old world arenaviruses
DQ328875	Mopeia virus	MOPV	Old world arenaviruses

表2 アレナウイルス科L-Segment内の共通性が高い領域を増幅するプライマーセット(2010年度)

クラスター名称	Forward primer	Reverse primer	L-segment内の領域	平均的増幅産物
L4	GSCCCCA YTTKGAAT G	AAGAACARGT WGGWA GYAATAGRGA	3529-3745	216
L5	TCATCWCCCARACA WARAA YCT	CATWYACYTCTAGTGAT GAYCAAAT	2944-3159	195

表3 ハンタウイルス用プライマーの検証対象としたウイルス種(2010年度)

Accession	種名	Strain
GQ120966	Hantaan virus	A18
EF077656	Hantaan virus	N8
FJ811839	Seoul virus	ZJ5
AB027521	Seoul virus	Gou3
GU904035	Dobrava-Belgrade virus	
AF458104	Seoul virus	IR461
AF288645	Hantaan virus	A16
EF117248	Seoul virus	ZT71
EF371454	Amur virus	JilinAP06
TIDG1G2A	Thailand virus	

表4 ハンタウイルス属M-Segment内の共通性が高い領域を増幅するプライマーセット(2010年度)

クラスター名称	Forward primer	Reverse primer	L-segment内の領域	平均的増幅産物
M2	ARYGCAARGAYCC WGAYGGGDAT	CCWACMCCWGARC CCCA	2859-3020	141
M3	WAARGGBTCTYAT GGTTTGYGA	GGYTACARTGKGTR AARCA	1657-1776	119

表5 検出試験の対象材料(2011年度)

番号	発症動物	CPE	予想されたウイルス
1	ネコ	口腔ぬぐい液を接種したfcwf-4細胞	レトロ
2	ウシ	空腸乳剤を接種したHmLu-1細胞	パラミクソ
3	ヒヨドリ	総排泄孔付近の腸管乳剤を接種したCaco-2細胞	レオ

表6 ウイルス検出試験に用いられたハンタウイルス(2012年度)

ウイルス種	株	ロット
Dabieshan	NC167	Passage-1
Dobrava-Belgrade	Saaremaa	Okumura
Dobrava-Belgrade	Slovakia	Okumura
Soul	Gou3	Passage-1
Thailand	Thai749	Day7 0302104
Seoul	SR-11	031500
Hantaan	Clone-1	910107-VE 032900-VO

表7 アルゴリズム上プライマー設計対象となるウイルス科ごとの遺伝子グループ数および10種以上のウイルスが含まれる遺伝子グループ (2011年度)

	設計可能な遺伝子グループ数	10種以上の遺伝子グループ数
アデノウイルス科	15	15
アレナウイルス科	12	9
ブニヤウイルス科	19	7
カリシウイルス科	13	4
コロナウイルス科	17	8
フィロウイルス科	1	1
フラビウイルス科	44	10
へペウイルス科	2	2
ヘルペスウイルス科	113	9
オルソミクソウイルス科	171	9
パピローマウイルス科	12	8
パラミクソウイルス科	20	6
パルボウイルス科	8	8
ピコルナウイルス科	15	6
ポリオーマウイルス科	4	4
ポックスウイルス科	52	29
レオウイルス科	32	2
ラブドウイルス科	9	3
トガウイルス科	4	3